

レシチン・コレステロール アシトランスフェラーゼ活性におよぼす酸化リポタンパク質の影響に関する研究

著者	神山 伸
号	564
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/10097/16699

氏 名(本籍)	かみ 神	やま 山	しん 伸
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 5 6 4 号		
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科食糧化学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	レンチン・コレステロール アシルトランスフェラー ゼ活性におよぼす酸化リポタンパク質の影響に関する 研究		
論文審査委員	(主 査) 教 授 古 川 勇 次 教 授 大 類 洋 教 授 大久保 一 良		

序章

血漿 HDL レベルと虚血性心疾患 (Coronary Heart Disease; CHD) との間に逆相関があることは疫学調査によって確証されており、HDL によるこの抗動脈硬化作用が末梢細胞からの過剰のコレステロール除去作用、いわゆるコレステロール逆転送系 (Reverse-Cholesterol Transport; RCT) に関連していることは広く知られている。すなわち、細胞から引き抜かれたコレステロールは LCAT によってエステル化され、このエステル化されたコレステロールが apo B を含みリポタンパク質に転送され、LDL receptor を介して肝臓に排泄されると考えられている。

LCAT (Lecithin-cholesterol acyltransferase) [EC 2.3.1.43] は専ら HDL 表面に結合して存在し、phosphatidylcholine (PC) の 2 位の脂肪酸を unesterified cholesterol の 3 β -OH 基に転移することにより cholesterol ester を生成する酵素である。泡沫細胞を含む種々末梢細胞の cholesterol は HDL のいわゆる脂質逆転送系によって肝臓に運ばれると考えられており、この LCAT 反応はその first step である cholesterol 引き抜きに於て、その細胞膜から HDL への移行を持続させる上で重要な役割を果たしている。(Fig. 1-1)。

血漿中のフリーラジカルによって、LDL 同様に HDL も酸化を受けることが知られており、最近になって酸化による HDL 代謝の変化と、その動脈硬化症進展におよぼす影響について焦点が当てられつつある。一方、HDL 代謝で中心的な役割を果たしている酵素である LCAT に関しては、LCAT が HDL を構成する脂質を基質とし、HDL 上の apo A-I を補酵素として機能しているにも拘らず、フリーラジカル生成による HDL の

酸化がこの血漿LCAT反応に及ぼす影響に関する研究はほとんどない。また、最近の研究ではHDLの抗酸化作用など、コレステロール逆転送系以外の抗動脈硬化作用が示唆されている。しかし、これらの研究の多くはHDLとapo A-Iに関するものであり、HDL上で反応している酵素であるLCATと酸化脂質との関連については、いくつかの最近の研究によってLCATの酸化脂質代謝酵素としての可能性が示されているものの、その生体内での意義は未だ不明である。

本研究は、血漿中のフリーラジカルの生成とそれによるリポタンパク質の酸化がLCATによるコレステロールエステル生成反応にどのような影響を及ぼしているかを調査し、そのHDLによる脂質逆転送系への影響を明らかにすることを目的として行った。また、酸化脂質とLCAT反応とのかかわりについて、この酸化脂質の代謝へのLCATの関与の可能性を明らかにすることを目的として、特に酸化ステロールに対するLCATの作用を調査した。

すなわち、第一章では基質であるHDL自身の酸化および、酸化リポタンパク質の生成が血漿LCAT活性に及ぼす影響について調べた。更に、第二章ではコレステロール酸化生成物に対するLCAT活性を検討することにより、LCATによる酸化ステロールの排除促進作用の可能性について考察を行った。そして、第三章では生体内で脂質過酸化によってLCAT活性が変動する可能性をさぐるため、ラットに酸化開始剤を投与したときの血漿LCAT活性の変動と、それによる抗酸化ビタミンの防御作用を調査した。これらの研究を通して、LCAT反応が生体内で酸化リポタンパク質にどのように影響しているかを考察した。

第一章 血漿 LCAT 活性におよぼす酸化リポタンパク質の影響

第一章では、血漿中のフリーラジカルの生成とそれによるリポタンパク質の酸化が、LCATによるコレステロールエステル生成反応にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的として行った。すなわち、1. 全血漿の酸化、2. LDL, HDL の酸化、3. 精製酵素を用いた反応系での基質酸化、のそれぞれについて、LCAT活性におよぼす影響を検討した。

[実験方法]

LCAT・apo A-I の精製 ヒト血漿 LCAT は Doi and Nishida の方法に基づいて精製した。原血漿に対しておよそ 6900 倍に精製された。apoA-I はヒト血漿より Sephadex G-150, DEAE-cellulose column を用いて精製した。

リポソームの調製 リポソームは egg yolk phosphatidylcholine, cholesterol および ^{14}C -cholesterol を用いて、Batzri and Korn の方法によって調製した。

LDL, HDL の調製・酸化 LDL ($d=1.006-1.063$), HDL ($d=1.063-1.21$) はヒト新鮮血漿より超遠心によって調製した。酸化 LDL, HDL は $5\ \mu\text{M}$ CuSO_4 あるいは 2mM AAPH と 37°C で 24 時間インキュベーションすることによって調製した。

LCAT 活性測定 LCAT 活性はリポソーム、精製酵素、精製補酵素を含む構成系で、あるいは血漿を用いる Stokke and Norum 法で測定し、1 時間の反応時間にエステル化された cholesterol の量を nmol 単位で表した。

[結果・考察]

1. フリーラジカル生成と血漿 LCAT 活性

AAPHによってヒト血漿中にフリーラジカルを生成させた場合の血漿 LCAT 活性の変化を Fig. 1-2 に示した。血漿 LCAT 活性は酸化時間に応じて低下し、24 時間後では血漿 LCAT 活性はコントロールの血漿の 60 %まで低下した。AAPH は水溶性の free radical initiator であり、熱分解によって定時的にラジカルを生成すると考えられている。水相の抗酸化剤としてアスコルビン酸を、連鎖切断型抗酸化剤として α -Tocあるいは probucol を用い、これらの抗酸化剤によって AAPH による LCAT 活性の阻害が改善されるか否かの実験を行った。Fig. 1-3 に示したように、100 mM のアスコルビン酸の存在によって LCAT 活性はもとの 89 %にまで回復したが、 α -Toc、probucol の添加では改善はみられなかった。

2. 酸化 LDL, HDL による血漿 LCAT 活性阻害

血漿に酸化 LDL, HDL を添加した場合の LCAT 活性の変動を Fig. 1-4, 1-5 に示した。native LDL および native HDL を添加した場合ではほとんど活性の低下がみられなかったのに対し、酸化 LDL および酸化 HDL の添加によって血漿 LCAT 活性は顕著に阻害された。この阻害は添加した酸化リポタンパク質の量に依存していた。

3. 基質リポソームの酸化が LCAT 活性に及ぼす影響

2 mM の AAPH で酸化した基質リポソームを用いた場合、Fig. 1-6 に示したように、LCAT 活性は酸化時間に応じて低下し、12 時間後にはほぼ完全に阻害された。この実験で用いたリポソームは、LCAT、apoA-I を含まない、リポソームのみを酸化したものである。従って、この活性

の低下は主に基質である脂質の酸化によるもので、酵素或いはapoA-Iの酸化変性のためではないと考えられ、この結果はLCATの基質である脂質部分の変化が重要な意義を持つことを示唆するものである。LCATの基質はHDL中のPCとcholesterolであるが、この阻害ではいずれの酸化が大きく影響しているか確認するため、以下の実験を行った。酸化したリポソームあるいは未酸化リポソームから脂質を抽出し、phosphatidylcholineおよびcholesterolを分離してリポソームを再び調製し、これを基質としてLCAT活性を測定した。Fig. 1-7に示したように、酸化phosphatidylcholineを含むリポソームの存在で活性は低下を示したが、酸化cholesterolを含むリポソームの存在では活性は低下しなかった。このことから、HDL上のphosphatidylcholineの酸化がLCAT活性に大きく影響を及ぼすものと考えられる。

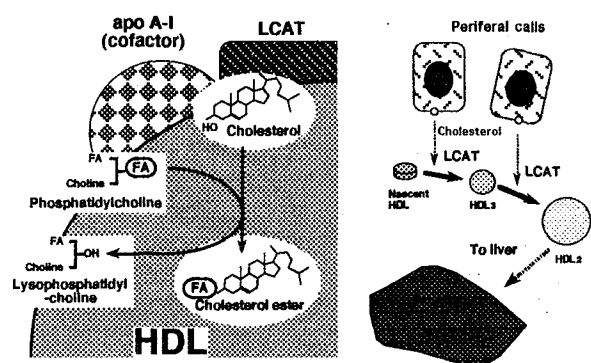


Fig. 1-1 Reaction and physiological function of lecithin-cholesterol acyltransferase

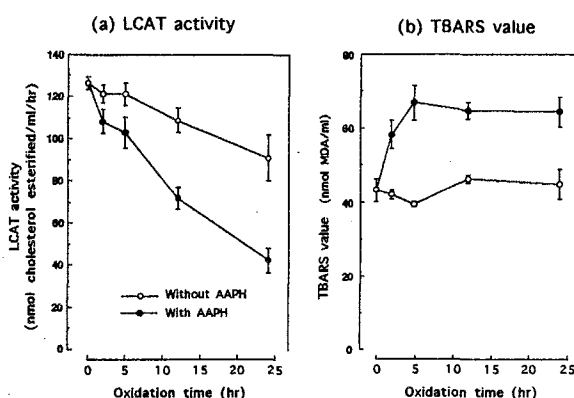


Fig. 1-2 Effect of incubation of plasma with AAPH on (a) LCAT activity and (b) TBARS value.

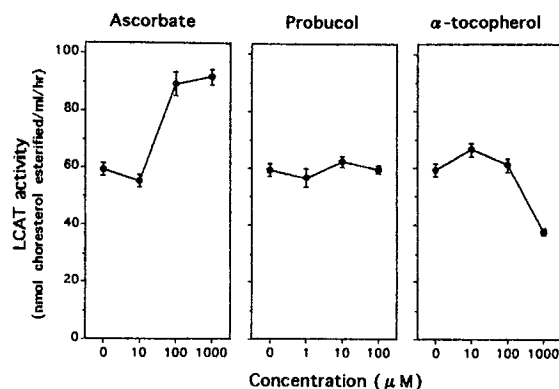


Fig. 1-3 Effect of antioxidants on inhibition of LCAT activity by oxidation with AAPH.

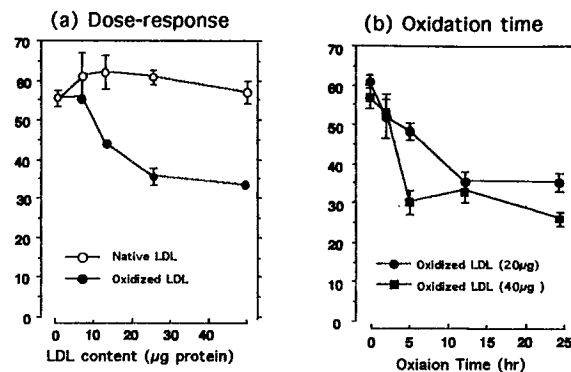


Fig. 1-4 Effects of oxidized LDL on LCAT activity

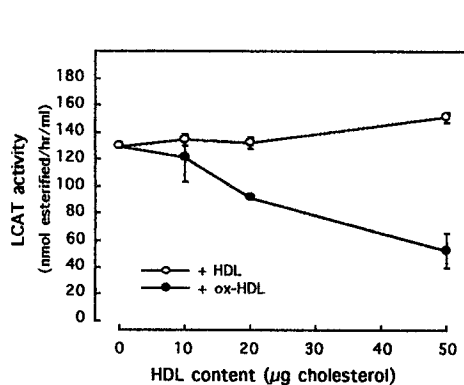


Fig. 1-5 Effect of oxidized HDL on plasma LCAT activity.

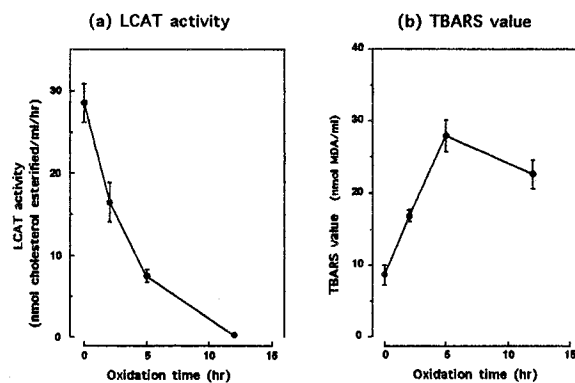


Fig. 1-6 Effect of oxidation of substrate liposome with AAPH on (a) LCAT activity and (b) TBARS value.

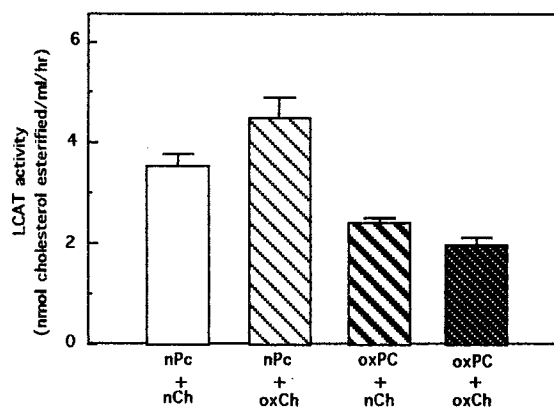


Fig. 1-7 Effect of oxidized phosphatidylcholine or oxidized cholesterol in substrate liposome on the LCAT activity.

第二章 酸化ステロールに対する LCAT の作用

酸化ステロールはその動脈硬化惹起性と血管障害性の両面から動脈硬化の発症および進展に大きくかかわっていると考えられている。血漿中のコレステロールエステルはそのほとんどがLCAT反応によって産生され则认为られているが、ヒト血漿中にエステル化された酸化ステロールが存在していることは、酸化ステロールが生体内でLCATによって代謝されている可能性を示している。

第一章での結果から、LCATの基質のうち phosphatidylcholine がされた場合ではLCAT活性は大きく低下したが、コレステロールの酸化ではLCAT反応は低下しなかった。このことは酸化ステロールが通常のコレステロールと同様にLCATの基質となりうる可能性を示唆しており、LCATが生体内で生成した酸化ステロールの排除に関与している可能性が考えられる。

第二章では、この酸化ステロールに対するLCATのエステル化作用について検討した。

[方法]

酸化ステロールに対する酵素活性 酸化ステロールは7-Keto, epoxy, 7-OH, 25-OH cholesterol についてのみ考察を行った。それぞれの酸化ステロール含むリポソームは第一章と同様に作成した。酵素反応後リポソーム中の各ステロール量を定量した。

また、酸化反応によって生成した酸化ステロールに対する酵素 LCAT の

影響については、各酸化ステロールは TLC (hexane : acetone : acetic acid=80 : 20 : 1) で分離し、それぞれを定量した。

[結果、考察]

各酸化コレステロールに対する LCAT 活性を Fig. 2-1 に示した。1 時間の反応では 7-Keto, epoxy, 7-OH cholesterol は cholesterol よりも低い活性を示したが、25-OH cholesterol のみ高い活性を示した。

リポソームを酸化した場合の各酸化ステロール生成量を Fig. 2-2 に示した。各酸化ステロールともに酸化時間に応じて生成量が増加し、7-Ketocholesterol がもっとも多く生成した。

リポソームを 12 時間酸化した後で LCAT 反応を行った場合での各酸化ステロール量の変化を Fig. 2-3 に示した。1 時間の反応によりリポソーム中の酸化ステロール量は 7-Keto, epoxy, 7-OH, 25-OH cholesterol が LCAT 反応前のそれぞれ 58, 63, 74, 16% まで低下し、Fig. 2-1 での結果と同様 25-OH cholesterol がもっとも減少率が大きかった。コレステロールに対する酸化ステロールの占める割合は LCAT 反応を行う前が 13% だったのに対し、LCAT 反応後では 8% に減少したことから、酸化リポソームでは酸化ステロールが優先的に代謝されることが示された。

酸化ステロールは動脈血管の障害、血管平滑筋細胞の障害・増殖、血管肥厚、血小板の内皮への吸着など、種々の動脈硬化促進作用を有しており、また、酸化コレステロールで飽和した HDL は細胞からのコレステロール除去作用に乏しいという報告があることから、LCAT 反応によるこの酸化ステロールのエステル化反応の生体内意義は大きいものと考えられる。

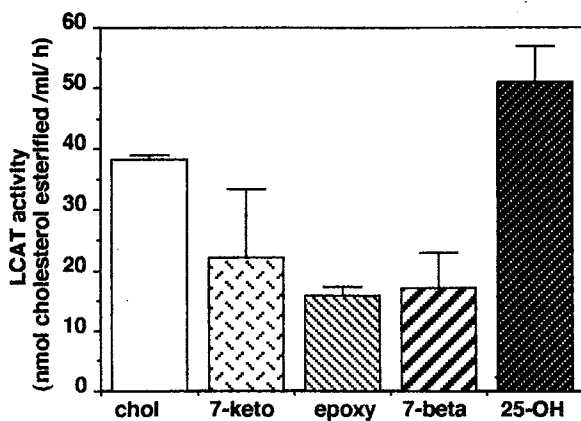


Fig. 3-1 LCAT activity for the substrate vesicle solution consisted with oxysterols

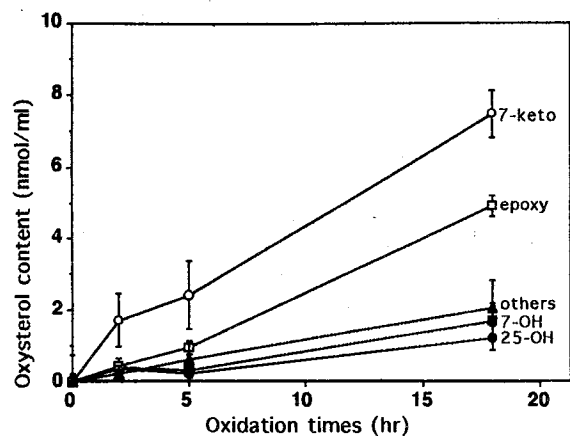


Fig. 3-2 Time-course of generation of oxysterols in the liposome during oxidation treatment

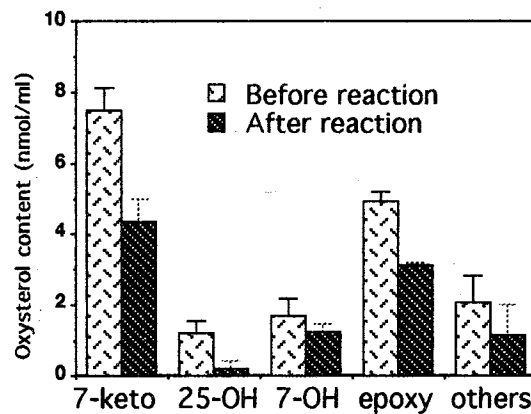


Fig. 3-3 Changes of oxysterol contents in the liposome after LCAT reaction

第三章 フリーラジカル開始剤投与によるラット血漿 LCAT 活性の変動

本章では、フリーラジカル開始剤をラットに投与した場合での脂質過酸化と血漿LCAT活性の変動を調査し、生体内での脂質過酸化が実際に

血漿 LCAT 活性に影響しうるかどうかを検討した。

[実験方法]

AAPH 投与実験 ラットに水溶性の free radical initiator である AAPH (2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride) を腹腔内投与することにより、in vivo で急性的な脂質過酸化を起させた。実験動物として male SD rat 6weeks を用い、control 群、AAPH 投与群 (AAPH 50mg/kg BW を腹腔内投与)、AAPH+V.E 投与群 (AAPH 投与の 24, 6 時間前に α -tocopherol 100mg/kg BW を経口投与)、AAPH+V.C 投与群 (AAPH 投与の 24, 6 時間前に L-ascorbic acid 100mg/kg BW を経口投与) を設けた。1 群各 5 匹の 4 群で実験を行った。12 時間の絶食後、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血した。血漿を分離し、血漿脂質、lipoprotein pattern、および血漿 LCAT 活性を測定した。

[結果、考察]

ラットに AAPH を腹腔内投与することにより、in vivo で急性的な脂質過酸化を起こさせた場合では、Fig. 3-1 に示すように急激な血中脂質の減少と lipoprotein pattern の変化がみられたが、V.E、V.C の抗酸化ビタミンの前投与によりこれは部分的に防禦された。V.E、V.C とともにその投与によって LDL、HDL の TBARS 値が増加していたが (Fig. 3-2)、血漿 LCAT 活性は AAPH 投与群で顕著に減少し、AAPH+V.E 群でも低値を示したが、AAPH+V.C ではこの減少は完全に防禦された (Table I)。このことから、血漿 LCAT 活性は生体内でも血漿中の free radical の生

成によって大きく影響されうる可能性が考えられる。またここではV.Cの投与が特に有効であった。

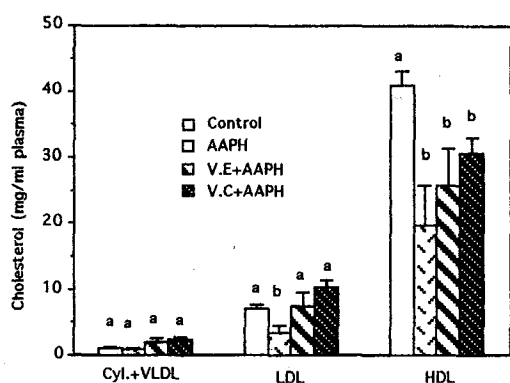


Fig. 3-1 Effect of AAPH and antioxidant vitamins administration on cholesterol concentration in SD rats plasma lipoprotein.

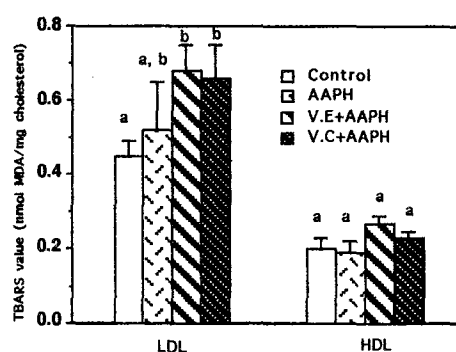


Fig. 3-2 Effect of AAPH and antioxidant vitamins administration on TBARS values in SD rats lipoprotein.

Table I Effect of AAPH and antioxidant vitamins administration on plasma LCAT activity in SD rats

Groups	LCAT activity (nmol cholesterol esterified/ml/hr)	
Control	70.84 ± 8.26	a
AAPH	36.97 ± 2.56	b
V.E+AAPH	50.62 ± 7.48	ab
V.C+AAPH	79.21 ± 7.35	a

総合考察

本研究によって得られた知見を以下にまとめた。

第一章では、LCAT 反応は基質の酸化に鋭敏であり、その構成脂質であるリン脂質の酸化によって活性は大きく低下すること、また、基質自体の酸化にとどまらず、酸化リポタンパク質の存在により LCAT 反応が大きく阻害されることを明らかにした。第二章では、生体内で酸化ステロールが LCAT によって代謝されている可能性を示し、LCAT によって酸化ステロールがエステル化されることにより、その生体からの排除の促進、HDL 中に閉じこめることによる毒性軽減作用の可能性を示した。第三章では、ラジカル開始剤である AAPH をラットに腹腔内投与することにより、生体内でリポタンパク質の酸化と LCAT 活性の変動が起こること、およびこの変動はビタミン C、ビタミン E の抗酸化ビタミンの投与によって防禦することができることを示した。

本研究により、血漿中でのフリーラジカルの生成によるリポタンパク質の酸化が、LCAT によるコレステロールエステル化を抑制し、コレステロール逆転送系の停滞をもたらす可能性が示された。また、LCAT による酸化ステロールのエステル化作用が示され、LCAT が酸化ステロールの生体からの排除の促進、および毒性軽減に関与している可能性が示された。HDL による脂質逆転送系は生体内でのもっとも優れた動脈硬化抑制機構として機能していることから、リポタンパク質の酸化が LCAT 活性の抑制を介してこの系にあたえる影響は多大であり、本研究による知見は、動脈硬化抑制機構の解明の一助になるものと考えられる。

論文審査結果要旨

レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) は専ら HDL 表面に存在し、レシチンの 2 位の脂肪酸をコレステロールの 3 β -OH 基に転移し、コレステロールエステルを生成する酵素である。泡沫細胞を含む種々の末梢細胞のコレステロールは HDL の、いわゆる脂質逆転送系によって肝臓に運ばれるものと考えられている。LCAT 反応は HDL 上のコレステロールをエステル化することによって、細胞膜から HDL へのコレステロールの移行を持続させ、血管壁へのコレステロールの過剰の沈着を予防する上で重要な役割を果たしている。

最近、酸化 LDL をはじめとするリポタンパク質の酸化による代謝の変化と、その動脈硬化症進展におよぼす影響について焦点が当てられている。ところが、抗動脈硬化作用で中心的な役割を果たしている HDL 代謝で、これに関与する LCAT 反応に関する研究はほとんど行われていない。また、酸化脂質に対しての LCAT の作用については、わずかに酸化脂質代謝酵素としての可能性が示されてはいるものの、その代謝の生体内での意義は未だ不明である。

本博士論文では、これらを明らかにする目的で、ヒト血漿から酵素 LCAT、補酵素アポ A-I を単離精製し、基質としては HDL あるいはレシチン・コレステロールリポソームを調製し、酸化脂質の LCAT 活性に及ぼす影響と、酸化脂質に対する LCAT の反応性を検討した。

まず、LCAT 活性は基質の酸化、特に、その構成脂質であるリン脂質の酸化によって大きく低下すること、また、基質自体の酸化の場合以外に、酸化 LDL、酸化 HDL の存在することによっても活性は強く阻害されることをはじめて明らかにした。さらに、生体内で酸化ステロールが LCAT によって代謝されていることを示し、酸化ステロールを LCAT がエステル化することにより、その生体からの排除の促進、あるいは HDL 中に閉じこめることによる毒性軽減作用を果たしている可能性を示唆した。これらの現象をふまえて、ラジカル開始剤である AAPH をラットに腹腔内投与することにより、生体内でリポタンパク質を酸化した場合、LCAT 活性の低下が起こること、この低下が抗酸化ビタミンであるビタミン C、ビタミン E の投与によって防御され得ることを認め、生体内でも脂質過酸化の程度によって LCAT 活性が変動することを示した。

以上のように、本研究は血漿中でのフリーラジカルの生成によるリポタンパク質の酸化が、LCAT によるコレステロールエステル化を抑制し、コレステロール逆転送系の停滞をもたらす可能性を示したこと、また、LCAT による酸化ステロールのエステル化作用を明らかにすることにより、LCAT が酸化ステロールの生体からの排除の促進、および毒性軽減に関与している可能性を示唆した。HDL による脂質逆転送系は生体内での最も優れた動脈硬化抑制機構として機能しており、本研究は酸化リポタンパク質の新しい生理作用を発見し、解析したもので、抗動脈硬化機構の解明の一助になるものと考えられ、審査員一同は、本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。